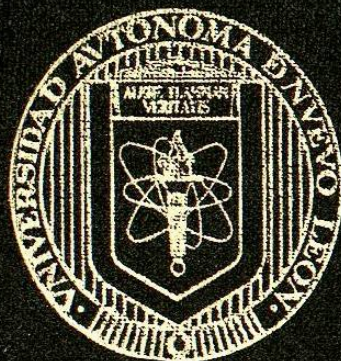


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACION DEL EFECTO DE LA COMBINACION
DEL ACIDO 2,3- DIMERCAPTOSUCCINICO (DMSA)
CON ANTIOXIDANTES EN LA INTOXICACION
POR PLOMO EN RATAS**

Por

Q.F.B. YOLANDA ALCARAZ CONTRERAS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Farmacología y Toxicología**

Febrero, 2005

TD
RA1231
.L4
A4
2005
c.1

Q.F.B. YOLANDA ALCARAZ CONTRERAS



1080127183

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA

INVESTIGACIÓN EN LA
INTOXICACIÓN POR PLOMO EN RATAS

BT
1601AD
M.L.
M.A.
2005

Aprobación de la Tesis:



Dr. Med. LOURDES GARZA OCANAS
Co-Director de Tesis

EVALUACION DEL EFECTO DE LA COMBINACION
DEL ACIDO 2,3- DIMERCAPTOSUCCINICO (DMSA)
CON ANTIOXIDANTES EN LA INTOXICACION
POR PLOMO EN RATAS

DR. MARIA TERESA ZANATTA CALDERON
Comisión de Tesis

Por

Q.F.B. YOLANDA ALCARAZ CONTRERAS

DR. VICTOR ARMANDO FAMEZ RODRIGUEZ
Comisión de Tesis

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Farmacología y Toxicología

de Estudios de Posgrado




Febrero, 2005

TD
RA1231
.24
A4
2005



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA COMBINACIÓN DEL ÁCIDO 2,3-DIMERCAPTOSUCCINICO (DMSA) CON ANTIOXIDANTES EN LA INTOXICACIÓN POR PLOMO EN RATAS

Aprobación de la Tesis:



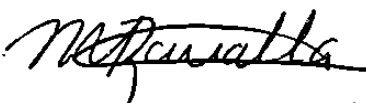
Dr. Med. OSCAR TORRES ALANIS
Director de Tesis



Dr. Med. LOURDES GARZA OCAÑAS
Co-Director de Tesis



PhD JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA
Co-Director de Tesis



DRA. MARIA TERESA ZANATTA CALDERON
Comisión de Tesis



DR. VICTOR ARMANDO TAMEZ RODRIGUEZ
Comisión de Tesis



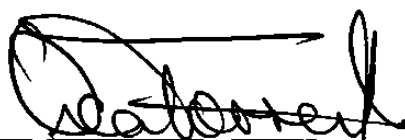
DR. DIONICIO A. GALARZA BELGADO
Subdirector
de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA COMBINACIÓN DEL ÁCIDO 2,3-DIMERCAPTOSUCCÍNICO (DMSA) CON ANTIOXIDANTES EN LA INTOXICACIÓN POR PLOMO EN RATAS.

Presentado por

Q.F.B. Yolanda Alcaraz Contreras

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la dirección del Dr. med. Oscar Torres Alanís y la codirección de la Dr. med. Lourdes Garza Ocañas.



Dr. med. Oscar Torres Alanís
Director de Tesis



Dr. med. Lourdes Garza Ocañas
Co-director de Tesis

Yolanda Alcaraz Contreras

Fecha de obtención de grado: Febrero 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA
COMBINACIÓN DEL ÁCIDO 2,3-
DIMERCAPTOSUCCÍNICO (DMSA) CON
ANTIOXIDANTES EN LA INTOXICACIÓN
POR PLOMO EN RATAS.

Número de páginas: 90

Candidato para la obtención del Grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en
Farmacología y Toxicología.

Área de Estudio: Farmacología y Toxicología

Propósito y Método de Estudio: El plomo (Pb) es un metal tóxico que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Se absorbe por la vía respiratoria, oral y cutánea. Los principales órganos afectados son: el sistema hematopoyético, cerebro, hígado, riñón y hueso (principal sitio de depósito). El Pb ejerce sus efectos tóxicos mediante un gran número de alteraciones bioquímicas, sin embargo, uno de los principales mecanismos de toxicidad es la generación de estrés oxidativo, caracterizado por un desbalance en la producción de radicales libres y las defensas celulares antioxidantes. Lo anterior ha sido motivo de que se haya propuesto el uso de antioxidantes como terapia coadyuvante de la intoxicación por Pb. Sin embargo, existe controversia en relación al posible efecto quelante que éstos pudieran tener; así como, su acción sobre la distribución o redistribución del Pb y el posible efecto sinérgico de los antioxidantes al ser administrados en combinación con terapia quelante. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de Vitamina C, Metionina y Glicina administradas como terapia individual y combinada con el ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) en la intoxicación por Pb en ratas. Los parámetros evaluados fueron: 1) niveles de Pb en sangre, cerebro, hígado, riñón y hueso, 2) la actividad de la enzima ácido delta aminolevulínico deshidratasa (d-ALA) y 3) niveles de glutatión (GSH) y de lipidoperoxidación (LPO) hepático y renal.

Contribuciones y Conclusiones: Con los resultados obtenidos se concluye que la Vitamina C, Metionina y Glicina administradas como terapia individual no tuvieron efecto quelante del Pb en sangre ni restituyeron la actividad de d-ALA. Los tres antioxidantes produjeron movilización de Pb de hueso sin redistribución del metal hacia cerebro, hígado o riñón. Se demostró que el DMSA además de quelar el Pb en sangre y órganos y restituir la actividad de d-ALA, incrementó los niveles de GSH y disminuyó la LPO a nivel hepático y renal en el mismo grado que los antioxidantes. Se estableció que la Vitamina C, Metionina y Glicina no tuvieron efecto sinérgico en cuanto a la acción quelante del DMSA al ser administrados como terapia conjunta.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



Dr. med. Oscar Torres Alanís

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su cariño incondicional y por apoyarme siempre.

Al Dr. med. Oscar Torres Alanís y Dr. med. Lourdes Garza Ocañas (Director y Codirector de este trabajo) por su apoyo, sus enseñanzas, su tiempo y sugerencias para la realización de este trabajo.

A los miembros del comité de Tesis, PhD Julio Sepúlveda Saavedra, Dr Teresa Zanatta Calderón y Dr. Víctor Tamez Rodríguez por sus sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

Al Dr. med. Alfredo Piñeyro López por su apoyo y enseñanzas.

Al M.C. Rubén Luján por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de los resultados de este trabajo.

Al QCB Arturo Longoria y QCB Mónica González por su apoyo en el manejo del equipo de Absorción Atómica.

A PAICYT UANL por el apoyo otorgado mediante el proyecto SA967-04.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MATERIAL Y MÉTODOS	20
2.1 Material	20
2.1.1 Material biológico	20
2.1.1.1 Animales	20
2.1.2 Equipo	20
2.1.3 Reactivos y material general	21
2.2 Métodos	24
2.2.1 Modelo de intoxicación por plomo en ratas Wistar	24
2.2.2 Administración del DMSA y antioxidantes	25
2.2.3 Obtención de muestras	26
2.2.4 Determinación de proteínas por el método de Lowry	27
2.2.4.1 Solución estándar de albúmina	27
2.2.4.2 Curva de calibración	28
2.2.4.3 Procedimiento	28
2.2.4.4 Cálculos	29

Capítulo	Página
2.2.5 Determinación de los niveles de Pb	29
2.2.5.1 Tratamiento de la muestra	29
2.2.5.1.1 Sangre	29
2.2.5.1.2 Tejidos	29
2.2.5.2 Estándares de Pb	30
2.2.5.3 Procedimiento	31
2.2.5.4 Curva de calibración	32
2.2.5.5 Cálculos	32
2.2.6 Determinación de hematocrito	33
2.2.7 Evaluación de la actividad de d-ALA	33
2.2.7.1 Hemólisis de la muestra	34
2.2.7.2 Procedimiento	34
2.2.7.3 Cálculos	34
2.2.8 Determinación de los niveles de glutatión	35
2.2.8.1 Solución estándar de glutatión	35
2.2.8.2 Tratamiento de la muestra	35
2.2.8.3 Curva de calibración	35
2.2.8.4 Procedimiento	36
2.2.8.5 Cálculos	36
2.2.9 Determinación de los niveles de lipidoperoxidación	37
2.2.9.1 Solución estándar de MDA	37
2.2.9.2 Curva de calibración	37

Capítulo	Página
2.2.9.3 Procedimiento	38
2.2.9.4 Cálculos	39
2.3 Análisis estadístico	39
3 RESULTADOS	40
3.1 Modelo de intoxicación por Pb en ratas	40
3.2 Efecto del DMSA y antioxidantes (Vitamina C, metionina y glicina) administrados como terapia individual y combinada sobre los niveles de Pb en sangre	42
3.2.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en sangre	43
3.2.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en sangre	44
3.2.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en sangre	45
3.3 Efecto del DMSA y antioxidantes (Vitamina C, metionina y glicina) administrados como terapia individual y combinada sobre los niveles de Pb en órganos	46
3.3.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en cerebro	46
3.3.1.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en cerebro	47
3.3.1.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en cerebro	48

Capítulo	Página
3.3.1.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en cerebro	49
3.3.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de Pb en hígado	50
3.3.2.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en hígado	51
3.3.2.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en hígado	52
3.3.2.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en hígado	53
3.3.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de Pb en riñón	53
3.3.3.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en riñón	54
3.3.3.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en riñón	55
3.3.3.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en riñón	56
3.3.4 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de Pb en hueso	57
3.3.4.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en hueso	58

Capítulo	Página
3.3.4.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en hueso	59
3.3.4.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en hueso	60
3.4 Efecto del DMSA y antioxidantes administrados como terapia individual y combinada sobre la actividad de la enzima d-ALA en sangre	61
3.4.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre la actividad de la enzima d-ALA en sangre	61
3.4.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre la actividad de la enzima d-ALA en sangre	62
3.4.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre la actividad de la enzima d-ALA en sangre	63
3.5 Efecto de los antioxidantes administrados como terapia individual y combinada sobre los parámetros de estrés oxidativo. Niveles de GSH y LPO hepático y renal	64
3.5.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de GSH en hígado	64
3.5.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de GSH en riñón	66
3.5.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de LPO en hígado	67
3.5.4 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de LPO en riñón	68

Capítulo	Página
4 DISCUSIÓN	69
5 CONCLUSIONES	80
PERSPECTIVAS	81
REFERENCIAS	82
APÉNDICE I	89
Reactivos para la determinación de proteínas	90

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Efecto del Pb sobre la síntesis del grupo hem	6
2. Oxidación de ALA y generación de radicales libres	7
3. Mecanismo mediante el cual el Pb produce estrés oxidativo	9
4. Niveles de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	43
5. Niveles de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	44
6. Niveles de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta)	45
7. Niveles de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	47
8. Niveles de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	48
9. Niveles de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta)	49
10. Niveles de Pb en hígado de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	51

Figura	Página
11. Niveles de Pb en hígado de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	52
12. Niveles de Pb en hígado de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta)	58
13. Niveles de Pb en riñón de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	55
14. Niveles de Pb en riñón de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	56
15. Niveles de Pb en riñón de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta)	57
16. Niveles de Pb en hueso de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	59
17. Niveles de Pb en hueso de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	60
18. Niveles de Pb en hueso de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta)	61
19. Actividad de la d-ALA en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	62
20. Actividad de la d-ALA en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	63
21. Actividad de la d-ALA en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta)	64

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Esquema de tratamientos evaluados	26
II. Curva de calibración para la determinación de proteínas	28
III. Concentraciones de Pb empleadas para la realización de la curva de calibración y del estándar de optimización de Pb	31
IV. Concentraciones de GSH empleadas para la realización de la curva de calibración	36
V. Concentraciones de MDA empleadas para la realización de la curva de calibración	38
VI. Niveles de Pb en sangre ($\mu\text{g}/\text{dL}$) y tejidos($\mu\text{g}/\text{g}$) en ratas Wistar machos intoxicadas con Pb	41
VII. Actividad de d-ALA (nmol de PBG/min/ml de eritrocitos)	41
VIII. Valores de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes administrados como terapia individual o combinada con DMSA	42
IX. Valores de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes administrados como terapia individual o combinada con DMSA	46

Tabla	Página
X. Valores de Pb en hígado de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes administrados como terapia individual o combinada con DMSA	50
XI. Valores de Pb en riñón de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes administrados como terapia individual o combinada con DMSA	54
XII. Valores de Pb en hueso de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes administrados como terapia individual o combinada con DMSA	58
XIII. Niveles de GSH hepático ($\mu\text{g/g}$ de proteína) de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	65
XIV. Niveles de GSH renal ($\mu\text{g/g}$ de proteína) de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	66
XV. Niveles de LPO hepático (nmol MDA/g de proteína) de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	67
XVI. Niveles de LPO renal (nmol MDA/g de proteína) de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA	68

NOMENCLATURA

ALA	Ácido delta aminolevulínico
%	Por ciento
δ	delta
μg	Microgramos
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
cols	Colaboradores
d-ALA	Ácido delta aminolevulínico deshidratasa
dL	Decilitros
g	Gramos
HCT	Hematocrito
i.p.	Intraperitoneal
kg	Kilogramo
M	Molar
$\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$	Miliohms por centímetro
MCV	Volumen corpuscular medio
MDA	Malondialdehído
min	Minutos
mL	Mililitros
n	Tamaño de la muestra
nm	Nanómetro
nmol	Nanomol
Pb	Plomo
PBG	Porfobilinógeno
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
PQM	Productos Químicos de Monterrey
ROS	Especie reactiva de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sodio
TCA	Ácido tricloroacético
UV	Ultravioleta
v.o.	Vía oral
Vis	Visible

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El plomo (Pb) es un metal pesado, de color gris, flexible, que se encuentra naturalmente en la corteza terrestre. Su forma más abundante es el sulfuro de Pb (PbS) formando las menas de galena. Con frecuencia se encuentra asociado a otros metales, como plata, cobre, zinc, hierro y antimonio. Por su bajo punto de fusión fue uno de los primeros metales utilizados por el hombre y su intoxicación crónica, el saturnismo, se conoce desde la antigüedad. El Pb forma aleaciones con muchos metales y en general, se emplea en esta forma en la mayor parte de sus aplicaciones. El uso más amplio se encuentra en la fabricación de acumuladores, forros para cable, elementos de construcción, pigmentos, gasolinas, soldadura y municiones.

La principal fuente ambiental de Pb ha sido la gasolina, que actualmente contiene concentraciones menores o bien en algunos tipos de ella, el Pb ha sido eliminado. La exposición al Pb en el medio profesional se produce en actividades de minería, fundiciones, fabricación y empleo de pinturas, baterías, tuberías, plaguicidas, envases con soldaduras de Pb, vajillas y cerámica. La intoxicación aguda no es común, sin

embargo, la exposición a dosis bajas a largo plazo ya sea en el medio laboral o a través del aire, el agua o los alimentos produce su acumulación en el organismo y da lugar a la aparición de toxicidad crónica. Debido a que la exposición a una cierta concentración de Pb es inevitable, la Norma Oficial Mexicana establece que los niveles de Pb en sangre en niños menores de 15 años y en mujeres embarazadas no deben sobrepasar los 10 $\mu\text{g/dL}$, mientras que en los adultos no expuestos ocupacionalmente se aceptan valores no mayores de 25 $\mu\text{g/dL}$.¹

El Pb puede ingresar al organismo por la vía oral, respiratoria y cutánea. La absorción gastrointestinal depende de la solubilidad, del tipo de sal y del tamaño de las partículas. Los adultos no absorben por esta vía más del 20-30% de la dosis ingerida pero en los niños la absorción es de hasta un 50%. En los pulmones el Pb se absorbe bien en forma de humos o partículas finas que son fagocitadas por los macrófagos alveolares. La absorción cutánea tiene escasa importancia aunque pueden absorberse de manera abundante las formas orgánicas.

La mayor parte del Pb circula unido a los eritrocitos, desde donde se distribuye a los tejidos de acuerdo con la tasa de flujo sanguíneo y en proporción a la afinidad tisular por este metal. La mayor concentración se alcanza en hueso, hígado, riñón, cerebro y bazo. La acumulación de Pb en hueso está influenciada por prácticamente todos los procesos que afectan el depósito o la movilización del calcio en el mismo. Dado que cerca del 95% de la carga corporal total de Pb se encuentra almacenada en este tejido, cada día se reconoce más el significado toxicológico del Pb, ya que la movilización que éste puede

tener en estados fisiológicos y patológicos en los que aumenta la resorción ósea (embarazo, lactancia, menopausia, inmovilidad, senectud, etc), causa efectos adversos en otros tejidos.²

Por otro lado, se ha reconocido que además de funcionar como un reservorio, el tejido óseo, es un importante blanco de la toxicidad causada por el Pb, cuyos efectos incluyen perturbación del desarrollo, formación y resorción ósea.^{3,4}

El Pb produce efectos tóxicos en la mayoría de órganos, sistemas y procesos fisiológicos entre los que se incluye el desarrollo de la línea roja hemática, los riñones, el sistema cardiovascular, el aparato reproductor y de mayor gravedad, el desarrollo del sistema nervioso central.

La naturaleza de las manifestaciones de toxicidad depende no sólo de la magnitud de la exposición sino también de las características de la persona expuesta; a este respecto es bien conocido que el factor nutricional y la edad son fundamentales en la intoxicación por Pb, como lo demuestran los estudios realizados tanto en humanos como en animales donde se ha observado que los efectos tóxicos son más severos en niños y en animales jóvenes que en los adultos.^{5,6} Lo anterior, ha sido relacionado a las diferencias toxicocinéticas que el Pb sigue en la población joven (mayor absorción gastrointestinal y respiratoria así como menor eliminación) lo que conduce a una mayor carga corporal del metal. Por otro lado, el grado de absorción aumenta en estados de desnutrición o bien, cuando la dieta carece o es deficiente en elementos esenciales, tales como hierro, calcio y zinc.⁷

La similitud química del Pb con el calcio, le permite interferir con diversas vías metabólicas en la mitocondria y en sistemas de segundos mensajeros que regulan el metabolismo energético, así como en los canales de calcio dependientes de voltaje que intervienen en la neurotransmisión sináptica, a los que inhibe, y en las proteínas-quinasas dependientes de calcio, que activa. Diversos sistemas de neurotransmisión afectados por el Pb están regulados por la acetilcolina, dopamina, noradrenalina, GABA y glutamato. El Pb es responsable también de una disminución de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa y un aumento de la bomba de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ lo que conduce a cambios en la contractilidad del músculo liso vascular.⁸⁻¹⁰

A pesar de la mencionada variedad de alteraciones bioquímicas que produce el Pb, cada vez se hace más evidente que el mecanismo por el cual ejerce sus efectos tóxicos es multifactorial; sin embargo, se ha propuesto que uno de los mecanismos más importantes es debido a la generación de un estado de estrés oxidativo,^{11,12} el cual no ha sido completamente aclarado a la fecha. Uno de los primeros estudios al respecto, fue realizado por Willis¹³ en 1965, quien reportó el papel de los metales en la oxidación de ácidos grasos insaturados y no fue sino hasta algunos años más tarde que otros investigadores reportaron una correlación directa entre la concentración de Pb y los niveles de lipidoperoxidación evaluados en distintos órganos.¹⁴⁻¹⁷

Dentro de los mecanismos propuestos mediante los cuales el Pb induce el estrés oxidativo están tanto el efecto directo producido por la acumulación del ácido delta aminolevulínico (ALA) que induce la generación de radicales libres, como el efecto sobre el sistema de defensa antioxidante de las células.^{18,19}

El estrés oxidativo se genera como consecuencia de la producción de especies reactivas de oxígeno (“ROS” por sus siglas en inglés), así como por la disminución de las defensas celulares antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el glutatión (GSH). Las ROS son moléculas que poseen en su estructura uno o más electrones no apareados, por lo que son compuestos altamente inestables en busca de un electrón que puede ser tomado de moléculas vecinas a ellos, lo que los convierte a su vez en otras moléculas inestables. Así, este proceso da lugar a que se inicie una serie de reacciones en cadena que terminan en daño celular.

En el organismo las ROS reaccionan con moléculas biológicas, DNA, proteínas y lípidos lo que conduce a producir mutaciones, alteraciones de proteínas o peroxidación de lípidos de membranas. Esta alteración junto con la inhibición de las enzimas antioxidantes lleva a la célula a ser más vulnerable al daño oxidativo y culmina en muerte celular.²⁰

La acumulación del ALA es consecuencia de la inhibición de dos enzimas importantes en la síntesis del grupo hem. Estas enzimas son la ácido δ aminolevulínico deshidratasa (d-ALA) que cataliza la conversión del ALA hacia porfobilinógeno²¹ y la enzima ferroquelatasa que incorpora hierro al anillo de protoporfirina IX para formar el grupo hem. Esta inhibición lleva a la disminución de la síntesis de hem, lo que a su vez estimula a la enzima ácido delta aminolevulínico sintetasa y como consecuencia ocurre un incremento en la producción de ALA, que se acumula debido a la inhibición en su conversión hacia porfobilinógeno.¹⁸ Figura 1

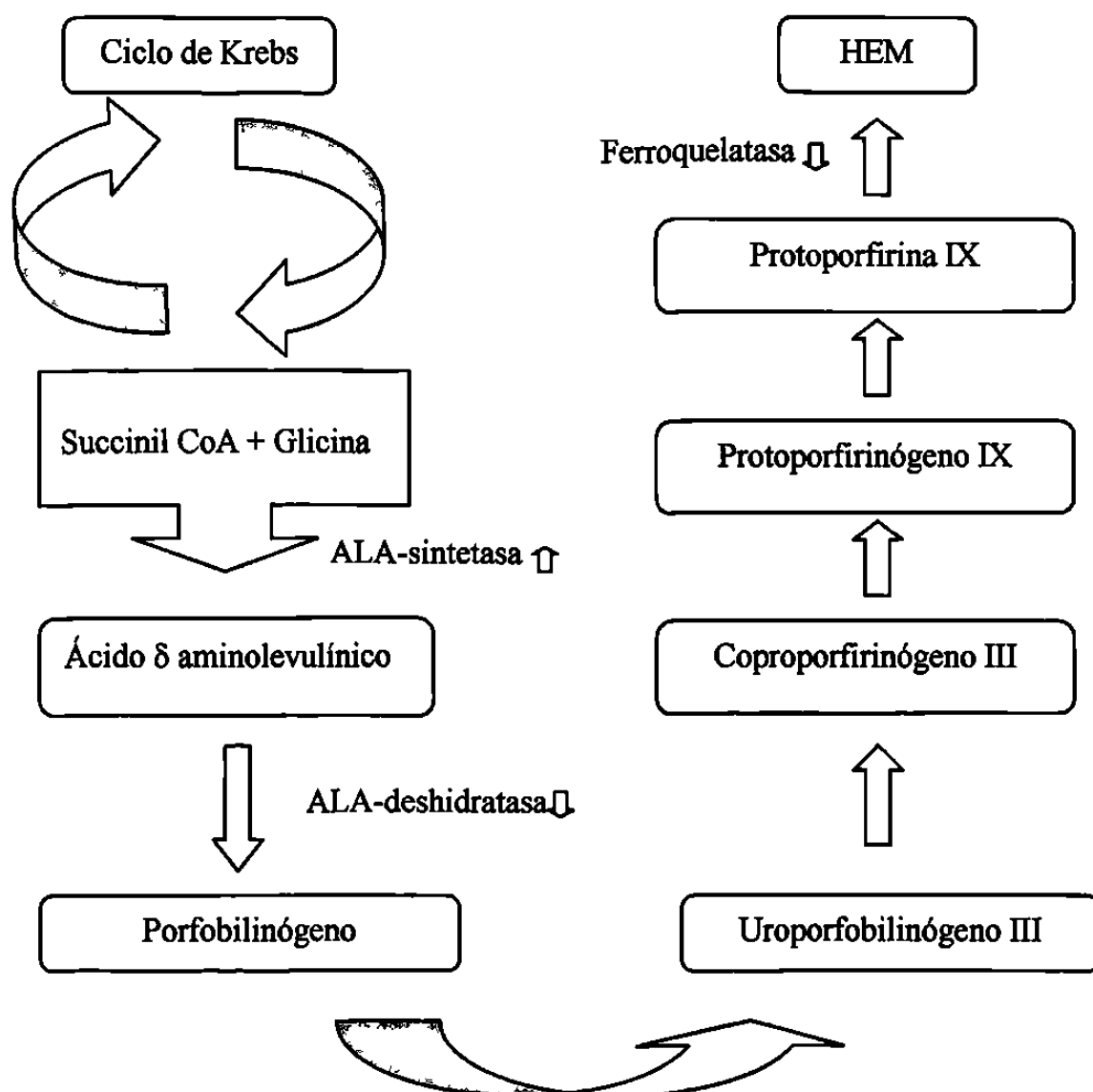


Figura 1. Representación esquemática del efecto del Pb sobre la síntesis del grupo hem.

A su vez, el exceso de ALA genera especies reactivas de oxígeno que se inician con la tautomerización de ALA al pH fisiológico lo que da lugar a una serie de reacciones en cadena que terminan con la producción de intermediarios alquilantes que se incorporan a la estructura del DNA.²² También se generan radicales hidroxilo que son considerados como las especies más reactivas.²³ Figura 2.

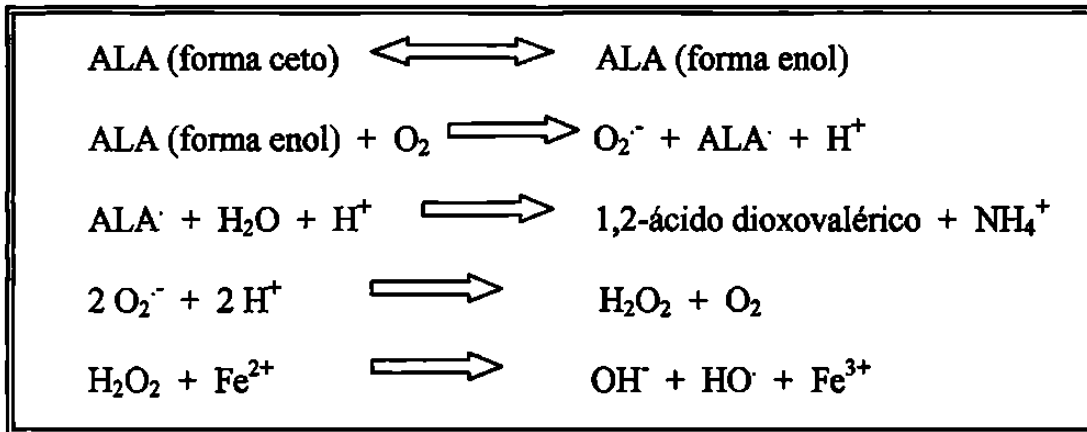


Figura 2. Oxidación de ALA y generación de radicales libres.

La célula cuenta con mecanismos de defensa que funcionan cuando el balance prooxidante-antioxidante está alterado. Estos sistemas son de tipo enzimático y no enzimático y ambos son capaces de detener la formación de radicales libres en el interior de la célula o bien de neutralizar los ya existentes.²⁰

El sistema antioxidante de tipo enzimático es una de las primeras defensas frente a la producción de radicales libres y se origina en el interior del organismo. Las principales enzimas que lo forman son: la glutatión peroxidasa (GPX), CAT y SOD. Estas enzimas son metaloproteínas que ejercen funciones antioxidantes y de detoxificación enzimática de peróxidos, peróxido de hidrógeno y radical superóxido respectivamente, sin consumirse al reaccionar con radicales libres. Son dependientes de ciertos cofactores que generalmente son metales, la GPX y la CAT dependen de selenio y hierro respectivamente; mientras que la SOD depende de cobre y de zinc para mantener la actividad enzimática y la estructura molecular. Se ha reportado que, tanto el cobre como el zinc son metales blanco de la toxicidad del plomo.^{24,25} La actividad de la GPX

disminuye al formarse un complejo entre el selenio y el Pb, por otro lado, la CAT es una enzima que contiene un grupo hem en su estructura por lo que en presencia de Pb disminuye su actividad al inhibirse la síntesis del hem.^{26,27}

El sistema de defensa antioxidante no enzimático, está formado por distintos compuestos que atrapan o neutralizan radicales libres lo que interrumpe las reacciones en cadena que propagan el daño que éstos producen. Los componentes de este sistema son principalmente exógenos e ingresan al organismo a través de los aportes de Vitamina E, Vitamina C, betacarotenos, polifenoles, flavonoides y oligoelementos. Existen también algunos compuestos de origen endógeno como el GSH, el urato y el ubiquinol los cuales a diferencia de las enzimas son consumidos rápidamente durante su acción antioxidante.

El GSH es un tripéptido formado por L-glutamato, L-cisteína y glicina, y es considerado como uno de los principales mecanismos no enzimáticos de defensa celular contra el estrés oxidativo.²⁸ Este compuesto actúa como coenzima o cofactor. El grupo sulfhidrilo (-SH) del GSH es altamente reactivo y dado que el Pb tiene una alta afinidad por los grupos tiol, su unión al GSH no es la excepción. De esta manera, el Pb interfiere con la actividad antioxidante del GSH y disminuye los niveles endógenos del mismo.^{28,29} De igual forma, la Vitamina E y la Vitamina C son antioxidantes importantes al limitar las reacciones oxidativas en cadena ya que producen la neutralización de los radicales libres mediante la transferencia de electrones pero sin dar lugar a la formación de otras moléculas inestables.

El esquema del mecanismo propuesto para la acción del Pb sobre el sistema de defensa antioxidante, la acumulación de ALA y la generación de ROS responsables del daño celular se muestra en la figura 3.

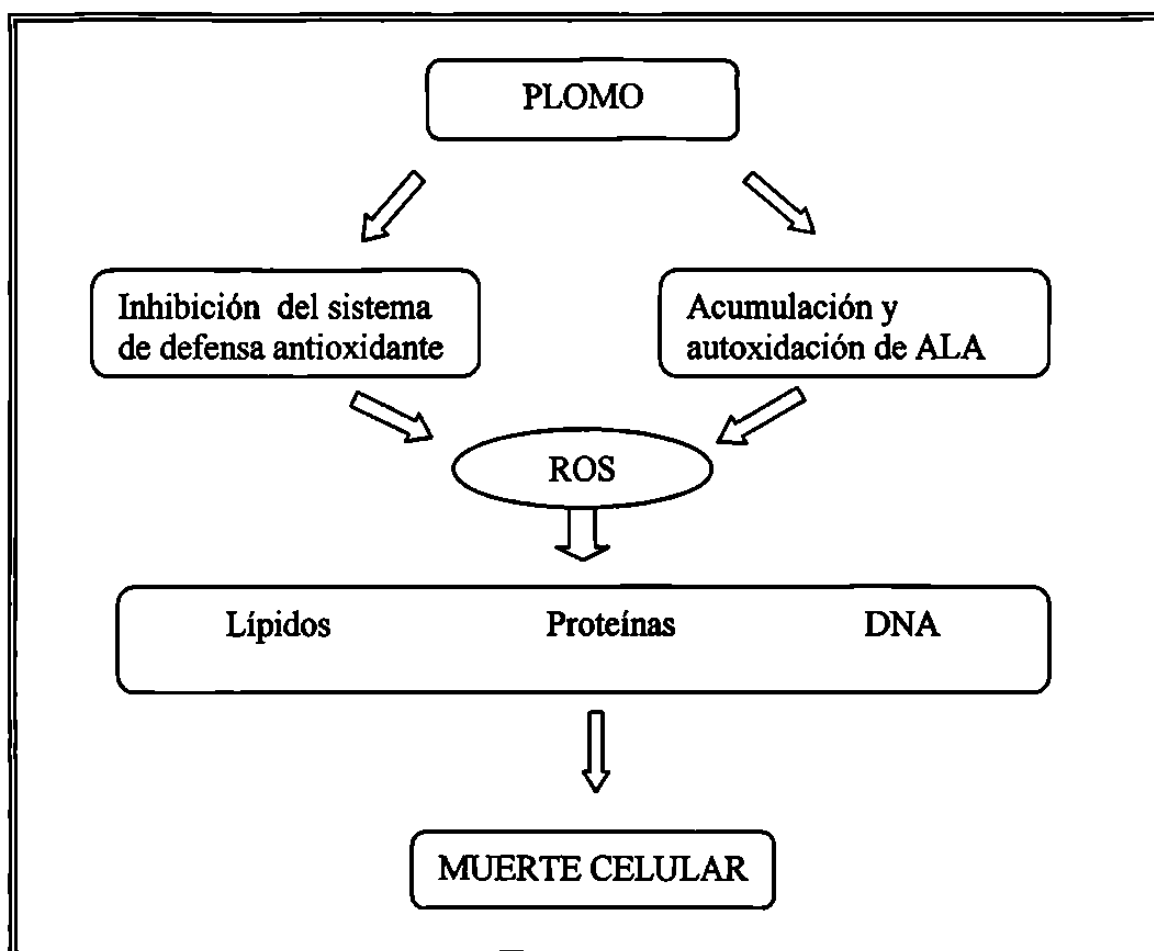


Figura 3. Mecanismo mediante el cual el Pb produce el estrés oxidativo.

Actualmente, los niveles elevados de Pb en sangre (mayores de $45\mu\text{g/dL}$) se tratan con terapia de quelación, donde el principal objetivo es eliminar el Pb del organismo antes de que ocurran cambios irreversibles, lo anterior, se logra mediante la formación de compuestos coordinados atóxicos e hidrosolubles que se eliminan por la orina.

Aunque el uso de los agentes quelantes no está aprobado en nuestro país, en Estados Unidos de América y en Europa, existen varios agentes quelantes disponibles, los cuales son prescritos de acuerdo a la concentración de Pb en sangre. El ácido etilendiamino tetracético disódico cálcico (EDTANa_2Ca), el 2,3 dimercaprol (British anti-Lewisite, BAL) y la D-penicilamina han sido extensamente utilizados en el tratamiento de esta intoxicación. A pesar de que los agentes quelantes reducen eficazmente los niveles de Pb en sangre, los efectos adversos que la mayoría de ellos producen son el principal limitante en su uso.

En el caso del EDTANa_2Ca , se ha reportado que produce una redistribución del Pb de hueso y riñón hacia el cerebro lo que aumenta el riesgo de encefalopatía, además, incrementa la excreción urinaria de metales esenciales.³⁰ Otra desventaja del tratamiento es su alto costo ya que se requiere de la hospitalización del paciente para su administración vía endovenosa. Por otra parte, la administración del BAL es vía intramuscular y es dolorosa. Este quelante, puede producir como efectos colaterales fiebre, taquicardia, náusea, vómito, sudoración y en pacientes con deficiencia de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) produce hemólisis.³¹ La D-Penicilamina produce náusea, vómito, eosinofilia, leucopenia, trombocitopenia y reacciones de hipersensibilidad. Además se ha reportado que incrementa la excreción urinaria de cobre, zinc y hierro.³²

Estas desventajas hicieron necesaria la búsqueda de agentes quelantes alternativos más seguros para el tratamiento de individuos con niveles elevados de Pb. Así, surgieron dos derivados análogos del BAL: el ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) y el ácido

2,3-dimercapto 1 propanosulfónico (DMPS). Estos quelantes tienen la ventaja de administrarse por la vía oral.³³

El DMSA es un quelante soluble en agua, aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso en niños. Moviliza el Pb de sangre y órganos sin producir su redistribución hacia el cerebro.³⁴⁻³⁷

Debido a que parte de la toxicidad del Pb ha sido relacionada con la producción de un desbalance entre el estado prooxidante-antioxidante del cuerpo y la generación de estrés oxidativo que culmina con el abatimiento de los mecanismos de defensa (principalmente glutatión) se ha propuesto que las sustancias antioxidantes pueden ser de beneficio como terapia coadyuvante en esta intoxicación.³⁸ En este sentido, uno de los antioxidantes más estudiados es la N-acetilcisteína (NAC). Gurer y cols.³⁹ evaluaron el efecto de NAC en ratas intoxicadas por Pb y tratadas con DMSA o NAC y reportaron que a pesar de que NAC produjo un incremento en los niveles de glutatión hepático abatidos por el Pb, no redujo los niveles de Pb en sangre, hígado o cerebro.

Por otro lado, Neal y cols.¹¹ reportaron que la NAC puede llegar a producir una disminución en los niveles de Pb en sangre por lo que se le atribuye cierta capacidad de quelación. En estudios realizados por Pande y cols.⁴⁰ se encontró que el tratamiento combinado de DMSA y NAC fue más efectivo en reducir la acumulación de Pb en sangre e hígado que la administración de cada uno por separado.

El interés por la evaluación del efecto de la administración de antioxidantes en la intoxicación por Pb ha hecho que muchos de estos compuestos hayan sido estudiados.⁴¹⁻⁴³ Al respecto, los resultados obtenidos por diferentes investigadores son contradictorios. Por lo anterior, el rol terapéutico de los antioxidantes en el tratamiento de la intoxicación por Pb aún no ha sido establecido.

De particular interés son los estudios realizados con ácido ascórbico y con metionina. El ácido ascórbico o Vitamina C es un potente antioxidante que ha sido evaluado en humanos y en animales con resultados contradictorios, tanto en lo relacionado a su efecto sobre la toxicocinética del Pb, como a su posible capacidad quelante. Goyer y cols.⁴⁴ reportaron que el ácido ascórbico tiene acción quelante y que su potencia es semejante a la producida por el EDTANa₂Ca. Flora y cols.⁴⁵ reportaron que la terapia coadyuvante de Vitamina C en la intoxicación por Pb en ratas, resultó ser efectiva al disminuir el Pb de sangre, hígado y riñón, al formarse un complejo de Pb y Vitamina C.

En otros estudios, se evaluó la efectividad de la Vitamina C administrada en combinación con compuestos quelantes como el EDTANa₂Ca, el ácido α -mercapto- β -(2-furil) acrílico (MFA) y el DMSA en ratas. En estos estudios se observó que la administración de la combinación del antioxidante con los quelantes fue más efectiva en incrementar la eliminación de Pb que la administración individual.^{44,46}

Por otro lado, Lauwerys y cols.⁴⁷ reportaron que la administración de Vitamina C a trabajadores expuestos a Pb no produjo ningún efecto benéfico sobre la concentración de

Pb en sangre, su eliminación o sobre los marcadores bioquímicos de la toxicidad de este metal. En investigaciones recientes, se ha reportado que existe una relación inversa entre los niveles de Pb en sangre y la ingesta de Vitamina C tanto en niños como en adultos.^{48,49} Además, se ha propuesto que la administración de suplementos con antioxidantes que contengan Vitamina C a trabajadores expuestos a Pb puede resultar benéfico al bloquear el estrés oxidativo generado por la exposición al Pb.⁵⁰

Patra y cols.⁵¹ evaluaron el efecto de alfa tocoferol, ácido ascórbico y L-metionina administrados individualmente y compararon su acción con la del EDTANa₂Ca. Los resultados de este estudio mostraron que los antioxidantes revirtieron el estrés oxidativo producido por el Pb pero no tuvieron ningún efecto sobre la concentración del metal en hígado, riñón y cerebro.

En el caso de la metionina, éste es un aminoácido esencial que contribuye en la síntesis de GSH, es precursor de cisteína y se ha propuesto que el grupo tiol de su estructura actúa como quelante del Pb en los tejidos.

Kachru y cols.⁵² evaluaron y compararon el efecto de la metionina con el del EDTANa₂Ca y la D-penicilamina y reportaron que la administración de metionina produjo un incremento en la excreción fecal de Pb, y que al ser administrada en combinación con los quelantes incrementó la eficacia de éstos en reducir la carga del metal en hígado y riñón, sin embargo, no tuvo ningún efecto sobre la concentración de Pb en sangre.

Flora y cols.⁵³ evaluaron el efecto de la combinación de zinc y metionina en el tratamiento de la intoxicación por Pb en ratas y reportaron que esta terapia produjo una disminución de la carga del metal en sangre, hígado y riñón. Esta misma combinación fue evaluada como suplemento durante la terapia de quelación con EDTANa₂Ca y DMPS y se reportó que la disminución en la carga corporal de Pb fue mayor que la que produjo la administración individual del quelante.⁵⁴ Por otro lado, Patra y cols.⁵¹ reportaron que el tratamiento con L-metionina en ratas intoxicadas por Pb no produjo disminución en los niveles de Pb en sangre, hígado, riñón y cerebro.

Recientemente, también se ha incrementado el interés por la evaluación del efecto antioxidante que ejerce la glicina. Este aminoácido que interviene en la síntesis de GSH, tiene un efecto protector contra el daño oxidativo producido por compuestos inductores de daño hepático mediado por generación de estrés oxidativo.^{55,56} Por otro lado, Shaikh y cols.⁵⁷ reportaron que la administración de glicina en ratas intoxicadas por cadmio evitó el daño hepático y renal al bloquear la lipidoperoxidación producido por este metal.

La mayoría de los estudios realizados a la fecha, en relación al efecto terapéutico de los antioxidantes en la intoxicación por Pb, se han enfocado principalmente a la evaluación del efecto de los mismos sobre parámetros indicativos de estrés oxidativo. Al respecto, también es importante señalar que en la mayoría de esos estudios los antioxidantes han sido administrados de manera individual a grupos de animales intoxicados con Pb y en pocos casos se han hecho comparaciones con grupos que recibieron quelante generalmente el EDTANa₂Ca o bien con grupos que no recibieron

ninguna terapia de quelación. En este contexto, a pesar de que se ha propuesto que algunos agentes antioxidantes pueden tener acción quelante, este efecto no ha sido demostrado. Por otro lado, no existen reportes en cuanto al efecto que estos antioxidantes pudieran producir sobre parámetros toxicocinéticos como son la distribución y/o redistribución del Pb, particularmente, su movilización de uno de sus principales órganos de depósito que es el hueso.

Por otro lado, la evaluación de un esquema de terapia conjunta (antioxidante y quelante) y del posible efecto sinérgico de los mismos basados en el concepto de dosis (concentración por tiempo), no ha sido realizada a la fecha.

Lo anterior, ha contribuido a la controversia que existe en relación al posible efecto benéfico de los antioxidantes en la intoxicación por Pb, a lo que se puede agregar el hecho de que en los estudios realizados, no se ha evaluado de manera sistemática la acción de los antioxidantes en la intoxicación por este metal mediante una correlación de su efecto sobre los niveles de Pb, tanto en sangre como en órganos blanco y de depósito con los parámetros indicativos de estrés oxidativo e indicadores biológicos de daño. La correlación de dichos parámetros permitirá establecer el efecto de los antioxidantes no sólo sobre la concentración de Pb en sangre, sino sobre la carga corporal del metal así como su impacto en el daño oxidativo producido por el Pb.

Algunos aspectos importantes por determinar en cuanto al efecto de los antioxidantes en la intoxicación por Pb son los siguientes:

- El posible efecto quelante de los antioxidantes.

- Su efecto sobre la distribución y/o redistribución del Pb (particularmente de hueso).
- La evaluación del posible efecto sinérgico de la terapia combinada (quelante-antioxidante).
- La evaluación de un rango de dosis que permita establecer si estos compuestos tienen o no acción quelante.

En el presente trabajo se evaluó y comparó de manera sistemática el efecto del ácido ascórbico, la L-metionina y la glicina en un esquema de terapia individual y combinada con DMSA en la intoxicación por Pb en ratas. Para la evaluación se consideraron parámetros indicadores de estrés oxidativo (niveles de glutatión y de lipidoperoxidación hepático y renal), niveles de Pb en sangre y órganos blanco de toxicidad (hígado, riñón y cerebro) y de depósito (hueso), así como la actividad de d-ALA.

HIPÓTESIS

La combinación de ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) y antioxidantes disminuye las concentraciones de Pb en sangre y órganos blanco e inhibe el estrés oxidativo producido por el metal en mayor grado que su administración por separado.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la combinación de DMSA y sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, metionina y glicina) en un modelo de intoxicación por Pb.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Establecer un modelo de intoxicación por Pb en ratas.**
- 2. Evaluar el efecto del tratamiento con DMSA y antioxidantes administrados de forma individual y combinada, sobre la concentración de Pb en ratas intoxicadas con este metal.**
- 3. Evaluar el efecto del tratamiento con DMSA y antioxidantes administrados de forma individual y combinada, sobre la distribución y/o redistribución de Pb en órganos blanco (hígado, cerebro y riñón) y de depósito (hueso).**
- 4. Evaluar el efecto del tratamiento con DMSA y antioxidantes administrados de forma individual y combinada, sobre la actividad de d-ALA en sangre.**
- 5. Evaluar el efecto del tratamiento con DMSA y antioxidantes administrados de forma individual y combinada, sobre los niveles de glutatión y de lipidoperoxidación.**

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Material Biológico

2.1.1.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar machos, con un peso de 160 ± 20 g. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándar de laboratorio, con ciclos luz-oscuridad de 12 horas y temperatura de 22°C.

2.1.2 Equipo

Analizador Hematológico Celdyn 1400

Balanza analítica Mettler Toledo AB204

Balanza granataria Mettler-Toledo PB3002

Centrífuga Beckman Avanti 30

Centrífuga Beckman Spinchron KR

Desionizador de Agua Millipore

Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer. Lámpara de Pb de cátodo hueco. Tubos de grafito pirolítico

Espectrofotómetro UV-Vis Beckman, modelo DU-7500, con arreglo de diodos y controlador de temperatura. Celdas de cuarzo

Homogeneizador Potter-Elvehjem con tubo de vidrio y pistilo de teflón

Horno de Microondas MDS-2000. Vasos para microondas

Potenciómetro Beckman Φ 50 pH meter

2.1.3 Reactivos y material general

1,1,3,3 tetraetoxipropano	Sigma
Ácido δ aminolevulínico	Sigma
Ácido acético glacial	PQM
Ácido etilendiamino tetraacético disódico	Sigma
Ácido metafosfórico	Sigma
Ácido nítrico	Fermont
Ácido perclórico	Merck
Ácido tiobarbitúrico	Sigma
Ácido tricloroacético	Sigma
Agua destilada	
Agua tipo I con resistividad de $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$	
Albúmina bovina	Sigma
Alcohol butílico	Fermont
Argón	
Carbonato de sodio	Merck

Cloruro de mercurio	Sigma
Cloruro de sodio	Sigma
Controles de Pb en sangre (Material de Referencia)	CONTOX
Disolución espectrofotométrica de Pb	CENAM
DMSA Chemet®	Sanofi-synthelabo
DTNB Reactivo de Ellman	Sigma
Duodecil sulfato de sodio	Sigma
Etanol	Fermont
Folin & Ciocalteu's	Sigma
Fosfato dibásico de amonio	PQM
Fosfato dibásico de potasio	Sigma
Fosfato dibásico de sodio anhidro	Baker
Fosfato monobásico de potasio	Sigma
Fosfato monobásico de sodio monohidratado	Sigma
Glicina	Sigma
Glutación	Sigma
Hidróxido de sodio	PQM
L-ácido ascórbico	Sigma
L-metionina	Sigma
Octal-fenoxi-polietoxietanol (Tritón X-100)	Sigma
Pentobarbital sódico inyectable	Pfizer
Piridina	Fermont
Reactivo de Ehrlich	Sigma

Sulfato cúprico Sigma

Tartrato de sodio y potasio Sigma

Tris Base Sigma

Matraces volumétricos de diferentes capacidades

Pipetas automáticas y puntillas 100-1000 μL y de 1000-5000 μL Eppendorf

Pipetas automáticas y puntillas 2-20 μL , 10-100 μL , 20-200 μL Oxford

Pipetas volumétricas de diferentes capacidades

Pipeteador automático

Placa de calentamiento con agitador magnético Sigma

Sondas

Termómetro

Tubos al vacío con heparina sódica

Tubos de ensayo de diferentes capacidades

Vasos de precipitado de diferentes capacidades

Vórtex

2.2 Métodos

2.2.1 Modelo de intoxicación por plomo en ratas Wistar

Para establecer el modelo de intoxicación por Pb fue necesario realizar un estudio piloto para determinar la dosis, (concentración y tiempo) y la vía de administración a utilizar, para lo cual se evaluó la concentración del metal en sangre y tejidos con diferentes esquemas de administración del Pb.

En el estudio piloto se utilizaron ratas Wistar machos que fueron divididas en grupos con 4 ratas cada uno. Los animales se colocaron en cajas y tuvieron libre acceso a alimento y agua. El grupo 1 recibió una solución de acetato de Pb a una concentración de 3000 ppm que fue administrado *ad libitum* en el agua de beber durante 5 semanas. El grupo 2 recibió 3.5 mg de Pb/kg vía i.p. durante 7 días. Los grupos 3 y 4 recibieron 10 mg de Pb/kg mediante sonda orogástrica durante 4 semanas, administrado a las 11:00 a.m. y a las 7:00 p.m., respectivamente (lo anterior, para establecer la influencia del horario en la distribución del Pb hacia hueso). Al finalizar el periodo de intoxicación, los animales fueron anestesiados con una solución de pentobarbital sódico (33 mg/kg) administrado vía i.p. y se tomaron muestras de sangre mediante punción intracardiaca. La sangre fue colectada en tubos con heparina sódica como anticoagulante. Posteriormente, los animales fueron sacrificados y se extrajeron el hígado, riñón, cerebro y fémur para la determinación de la concentración de Pb y la evaluación de la actividad de la enzima d-ALA.

El esquema seleccionado para este estudio fue el de administración de Pb *ad libitum* con el que se obtuvo la mayor concentración de Pb en hueso. Las ratas fueron expuestas a acetato de Pb (3000 ppm) en el agua de beber durante 5 semanas.

2.2.2 Administración del DMSA y antioxidantes

24 horas después de haber terminado el periodo de exposición al Pb las ratas se pesaron, se identificaron y se dividieron al azar en grupos de 5 para recibir el tratamiento con los antioxidantes y el DMSA administrados individualmente o de manera combinada (antioxidante más quelante).

El grupo control negativo (no expuesto al Pb) recibió el solvente (agua) durante todo el experimento. El grupo control positivo (expuesto al Pb) sólo recibió agua como tratamiento. Los antioxidantes fueron evaluados a una dosis baja (100 mg/kg) y dosis media (500 mg/kg) administrados durante 5 días. Como dosis alta se administraron 1000 mg/kg durante 4 semanas. La dosis de DMSA fue de 182 mg/kg durante 5 días. En el caso de la dosis alta de los antioxidantes, primero se evaluó el efecto de su administración como terapia individual sobre los niveles de Pb en sangre y en caso de que tuvieran acción quelante se procedería a administrar la terapia combinada con el DMSA para evaluar su posible efecto sinérgico.

Los antioxidantes y el DMSA se disolvieron en agua y las soluciones fueron preparadas cada día, previo a su administración. Todos los tratamientos se administraron diariamente por la mañana mediante una sonda orogástrica y en el caso de los grupos que recibieron de manera combinada el quelante y el antioxidante la administración se

realizó con una hora de diferencia entre cada tratamiento. El esquema de los diferentes tratamientos utilizados se muestra en la tabla I.

Tratamiento	Dosis baja (mg/kg)	Dosis media (mg/kg)	Dosis alta (mg/kg)
Agua (control negativo)	3 mL	3 mL	3 mL
Agua (control positivo)	3 mL	3 mL	3 mL
DMSA	182	182	-----
Vitamina C	100	500	1000
L-Metionina	100	500	1000
Glicina	100	500	1000
DMSA + Vitamina C	182 + 100	182 + 500	-----
DMSA + L-Metionina	182 + 100	182 + 500	-----
DMSA + Glicina	182 + 100	182 + 500	-----

Tabla I. Esquema de los tratamientos evaluados. Las dosis baja y media se administraron durante 5 días y la dosis alta durante 28 días.

2.2.3 Obtención de muestras

24 horas después de concluido el tratamiento, las ratas fueron anestesiadas con una solución de pentobarbital sódico (33 mg/kg) administrado vía i.p. y se tomaron muestras de sangre mediante punción intracardiaca. La sangre fue colectada en tubos al vacío y libres de Pb, con heparina sódica como anticoagulante. Todas las muestras de sangre se

agitaron suavemente por inversión para mezclar con el anticoagulante y se mantuvieron a una temperatura de 4 °C para su conservación.

Posteriormente, las ratas fueron sacrificadas y se extrajeron los siguientes órganos: cerebro, hígado, ambos riñones y fémur derecho. El hígado fue perfundido *in situ* con una solución fría de NaCl 0.9% para eliminar los restos de sangre. El cerebro y los riñones fueron enjuagados con la misma solución para eliminar la sangre. Al fémur se le retiraron los restos de tejido. Los órganos fueron pesados, etiquetados y congelados inmediatamente.

Una parte del hígado y del riñón fue homogeneizada con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.01 M y cloruro de sodio 0.9% a pH 7.4 en una proporción 1:4 (p/v). El homogenado fue alicuotado en tubos eppendorf los cuales se mantuvieron almacenados a una temperatura de -20 °C hasta su utilización.

2.2.4 Determinación de proteínas por el método de Lowry

La concentración de proteínas fue determinada en alícuotas de homogenizados de hígado y riñón de acuerdo al método de Lowry ⁵⁸, donde la cantidad de producto formado depende de la concentración de proteína. Por lo tanto, un incremento de absorbancia a 750 nm es proporcional al incremento en la concentración de proteínas.

2.2.4.1 Solución estándar de albúmina

Se utilizó una solución estándar de albúmina bovina a una concentración de 100 µg/mL. La albúmina bovina se disolvió en agua destilada.

2.2.4.2 Curva de calibración

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de albúmina con un contenido de 12.5 a 100 μg de proteínas. Se utilizó un blanco de agua libre de iones el cual fue procesado bajo las mismas condiciones que los estándares. Las cantidades de los reactivos utilizados se describen en la tabla II. Cada estándar fue preparado por triplicado y el promedio de sus lecturas fue utilizado para graficar la curva de calibración.

Curva de calibración	Solución stock de albúmina (mL)	Agua destilada (mL)	Solución C (mL)	Folin (mL)
Blanco	0	1	5	0.5
1	0.125	0.875	5	0.5
2	0.250	0.750	5	0.5
3	0.5	0.5	5	0.5
4	1	0	5	0.5

Tabla II. Concentraciones utilizadas en la curva de calibración para la determinación de proteínas

2.2.4.3 Procedimiento

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de la muestra diluida (1:1000) más 5 mL de solución C (Apéndice I) y se agitó en vórtex. Esta muestra se dejó reposar durante 15 min y posteriormente se le adicionaron 0.5 mL del reactivo Folin & Ciocalteu y se agitó nuevamente en vórtex. Después de 20 min se midió la absorbancia de las muestras. Cada muestra fue evaluada por triplicado.

2.2.4.4 Cálculos

La concentración de proteínas de las muestras fue interpolada de la curva de calibración obtenida al graficar el valor de absorbancia contra la concentración de proteínas de los estándares, los valores obtenidos fueron ajustados con el método de mínimos cuadrados (programa estadístico del espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-7500).

2.2.5 Determinación de los niveles de Pb

La concentración de Pb en sangre y tejidos fue determinada por Espectrofotometría de Absorción Atómica con horno de grafito, automuestreador automático y corrector de fondo¹. El método se basa en que a partir de muestras y estándares de concentración conocida, se obtienen átomos de Pb en estado elemental, a través de los cuales se hace pasar un haz de luz de 283.3 nm. La cantidad de luz absorbida es proporcional al número de átomos presentes.

2.2.5.1 Tratamiento de la muestra

2.2.5.1.1 Sangre. Las muestras de sangre no requirieron de digestión previa para la determinación del Pb. Se usó sangre completa con anticoagulante.

2.2.5.1.2 Tejidos. Para determinar el contenido de Pb en tejidos se realizó una digestión ácida de los mismos en horno de microondas para eliminar las interferencias biológicas. A las muestras de hígado y riñón se les retiró el tejido parenquimatoso, al fémur se le retiró la médula ósea y para la determinación de Pb, se utilizó la porción correspondiente a la diáfisis. Para realizar la digestión se colocaron 0.5 g de la muestra y

5 mL de ácido nítrico concentrado en un vaso de teflón para el microondas. Los vasos fueron puestos dentro de una camisa de seguridad y se cerraron. Cada vez que se realizó una digestión, se utilizó un vaso especial como controlador de la presión, en el cual se colocó la muestra de mayor tamaño o más reactiva. Los vasos fueron puestos en un carrusel y se conectaron a un sistema de seguridad localizado en el mismo carrusel. El proceso de digestión se realizó en 5 etapas con una potencia del 90% y un tiempo de 15 min para cada etapa. Una vez finalizado el proceso de digestión y cuando la presión y temperatura habían descendido, las muestras se recuperaron, se colocaron en un matraz volumétrico clase A y se aforaron a 10 mL con agua libre de iones (agua tipo I $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). En cada serie de digestión se corrió un blanco de reactivos, un tejido blanco y una muestra fortificada (tejido blanco adicionado con una concentración conocida del Pb). Las condiciones de operación del horno de microondas para el proceso de digestión de las diferentes muestras fueron optimizadas en el laboratorio.

Todo el material de vidrio utilizado para la preparación y el análisis de muestras para la determinación de Pb, que se usó más de una vez, se sometió a técnicas especiales de limpieza química con el fin de evitar contaminación por Pb y polvo.

2.2.5.2. Estándares de Pb

A partir de una solución estándar de Pb ($1000 \mu\text{g/mL}$), se preparó una solución intermedia de $10 \mu\text{g/mL}$. Se colocó en un matraz volumétrico 1 mL de solución estándar más 5 mL de ácido nítrico concentrado y se aforó a 100 mL con agua tipo I. Los

estándares para realizar la curva de calibración fueron preparados a partir de la solución intermedia como se indica en la tabla III.

Solución Pb 10 μ g/mL (μ L)	HNO ₃ (μ L)	Aforar con agua tipo I (mL)	Concentración final de Pb (μ g/mL)
Blanco	500	10	0
50	500	10	0.05
100	500	10	0.10
200	500	10	0.20
400	500	10	0.40
600	500	10	0.60
250	500	10	0.25

Tabla III. Concentraciones de Pb empleadas para la realización de la curva de calibración y del estándar de optimización de Pb (0.25 μ g de Pb /mL).

2.2.5.3 Procedimiento

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de Pb con un contenido de 5 a 60 μ g del metal. Se colocaron en copas de muestreo 100 μ L del estándar o de la muestra más 900 μ L de una solución modificadora de matriz biológica que contiene: fosfato dibásico de amonio, tritón X-100 y ácido nítrico concentrado ultrapuro. Se preparó también el estándar de optimización a partir de la solución de 25 μ g/dL así como, los controles de Pb en sangre con certificado de análisis, los cuales contienen un nivel alto (46 ± 5 μ g/dL), medio (23 ± 4 μ g/dL), y bajo (7 ± 3 μ g/dL) de Pb. Las muestras se homogeneizaron con agitación suave, al mezclar mediante bombeo repetido con la pipeta, utilizando la punta como agitador.

2.2.5.4 Curva de calibración

Antes de iniciar el análisis fue necesario optimizar la señal del equipo, para lo cual se colocó en el automuestreador una copa de muestreo con un blanco para ajustar el cero del instrumento, enseguida se inyectó el estándar de optimización 25 µg/L para obtener una altura de pico ≥ 0.18 . Las muestras fueron sometidas a un tratamiento térmico donde se obtuvieron los átomos de plomo en estado elemental. El análisis de los estándares de calibración se realizó midiendo la absorbancia de cada uno de los niveles de concentración para realizar la curva, el criterio de aceptación para determinar la linealidad de la curva fue un coeficiente de correlación $r^2 \geq 0.995$.

Una vez preparada la curva de calibración y aceptada la linealidad de respuesta, se procedió a analizar los controles de Pb en sangre con certificado de análisis. La determinación de Pb en las muestras reales procedió únicamente cuando los valores de los controles estaban dentro del intervalo certificado. Cuando una muestra excedió el intervalo lineal definido de la curva, ésta se analizó nuevamente, realizando la dilución adecuada. Después del análisis de un lote de 20 muestras se hizo una determinación alternada del control certificado bajo, medio y alto de Pb, para comprobar la calidad de los resultados. En caso de que la lectura del control de Pb, estuviera fuera del intervalo certificado se recalibró y se repitieron las lecturas del último lote de muestras.

2.2.5.5 Cálculos

La concentración de Pb de las muestras fue interpolada de la curva de calibración. Los niveles de Pb en sangre se reportan en µg/dL. Para las muestras a las que se les

realizó digestión ácida, los resultados se reportan en $\mu\text{g/g}$ de tejido y se consideraron tanto las diluciones realizadas como el peso de la muestra.

2.2.6 Determinación de hematocrito

El valor del hematocrito (HCT) se determinó en un analizador hematológico automatizado a partir del volumen corpuscular medio (MCV) y del número de eritrocitos (RBC) de la muestra de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{HCT} = (\text{RBC} \times \text{MCV}) / 10$$

El HCT se reportó como el porcentaje del paquete de eritrocitos y fue determinado el mismo día en que se colectaron las muestras de sangre.

2.2.7 Evaluación de la actividad de d-ALA

La actividad de d-ALA se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Tomokuni⁵⁹, la cual se basa en la medición espectrofotométrica del porfobilinógeno formado en un medio con exceso de ALA. El porfobilinógeno formado reacciona con el reactivo de Ehrlich y se desarrolla un color que se lee contra un blanco a una longitud de onda de 555 nm. La cantidad de porfobilinógeno formado es proporcional a la actividad de la enzima. La técnica se desarrolló el mismo día en que se obtuvieron las muestras de sangre (la enzima mantiene su actividad por un periodo de 24 horas a 4 °C).

2.2.7.1 Hemólisis de la muestra

La hemólisis fue realizada mediante la adición de 3.25 mL de agua destilada a 0.5 mL de sangre. La muestra se agitó y se incubó a 37 °C por 10 minutos para obtener una hemólisis completa.

2.2.7.2 Procedimiento

Se colocaron en un tubo 0.25 mL de solución amortiguadora de fosfatos a pH de 6.8, con 0.25 mL de ALA 0.02 M y se incubaron a 37 °C por 5 min. Posteriormente, se adicionaron 0.75 mL de la sangre hemolisada y se incubaron nuevamente durante una hora a 37 °C. Después del periodo de incubación, la reacción se detuvo mediante la adición de 0.5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% que contiene HgCl_2 0.1 M, posteriormente, los tubos se centrifugaron por 5 min a 3000 rpm. Finalmente, 0.5 mL del sobrenadante fueron mezclados con 1.5 mL del reactivo de Ehrlich y se agitó en vórtex. Las muestras se dejaron reposar durante 10 min a temperatura ambiente y la absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 555 nm. El blanco se preparó con 0.5 mL de agua destilada y 1.5 mL del reactivo de Ehrlich.

2.2.7.3 Cálculos

La actividad de la enzima se calculó a partir del valor de absorbancia dividido entre el valor del HCT y multiplicado por un factor de 109.4. La actividad de la enzima se reportó en nmol/min/mL de eritrocitos.

2.2.8 Determinación de los niveles de GSH

El GSH fue determinado en homogeneizados de hígado y riñón, mediante el método espectrofotométrico descrito por Ellman (1959)⁶⁰, que se basa en la medición de la absorbancia del complejo formado a 412 nm.

2.2.8.1 Solución estándar de GSH

Se preparó una solución de GSH a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. El GSH se disolvió en una solución fría de ácido metafosfórico al 3% y se preparó cada vez que se realizaron las determinaciones ya que es inestable.

2.2.8.2 Tratamiento de la muestra

Se colocaron 500 μL del homogeneizado en tubos para centrifuga y se mantuvieron sobre hielo. Se le agregó a cada tubo 1 mL de solución amortiguadora de solubilización y se agitó en vórtex. Las muestras se dejaron reposar 15 min y se agitó cada 5 min. Posteriormente, se les adicionó 1 mL de TCA al 5% y se agitó en vórtex durante 5 min. La muestra se centrifugó a 6000 rpm a 4°C durante 15 min. El sobrenadante fue utilizado para realizar las mediciones.

2.2.8.3 Curva de calibración

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de GSH con un contenido de 0.5 a 25 μg de GSH. Se utilizó un blanco de agua procesado bajo las mismas condiciones que los estándares. Las cantidades de cada reactivo empleadas para la preparación de la curva de calibración se describen en la tabla IV. Cada estándar

fue preparado por triplicado y el promedio de sus lecturas fue utilizado para graficar la curva de calibración.

Curva de calibración GSH	Sol amortig. de PO ₄ 0.05M (mL)	EDTA (μL)	Ácido metafosfórico (μL)	Solución stock de GSH (μL)	DTNB (μL)
Blanco	2.5	800	200	0	30
1	2.5	800	195	5	30
2	2.5	800	190	10	30
3	2.5	800	150	50	30
4	2.5	800	100	100	30
5	2.5	800	0	200	30
6	2.5	800	0	250	30

Tabla IV. Concentraciones de GSH empleadas para la realización de la curva de calibración.

2.2.8.4 Procedimiento

A 200 μL del sobrenadante se le agregaron 2.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M más 800 μL de EDTA y 30 μL del reactivo de Ellman (DTNB). Las muestras se agitaron en vórtex durante 20 segundos y la absorbancia de los estándares de la curva de calibración y de las muestras fue leída a 412 nm. Cada muestra fue evaluada por triplicado.

2.2.8.5 Cálculos

La concentración de GSH de las muestras fue interpolada de la curva de calibración obtenida al graficar el valor de absorbancia contra la concentración de GSH de los estándares, los valores fueron ajustados con el método de mínimos cuadrados (programa

estadístico del espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-7500). Los valores de GSH se reportaron en μg de GSH por mg de proteína.

2.2.9 Determinación de los niveles de LPO

El nivel de LPO en homogeneizados de hígado y riñón se determinó mediante la técnica del ácido tiobarbitúrico descrita por Ohkawa (1978)⁶¹. La técnica se basa en la lectura espectrofotométrica de la absorbancia del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) a 532 nm.

2.2.9.1 Solución estándar de MDA

Se preparó una solución del 1,1,3,3 tetractoxipropano a una concentración de 40 nmol de MDA/mL. Esta solución fue empleada para la preparación de los estándares de la curva de calibración.

2.2.9.2 Curva de calibración

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de MDA a una concentración de 0.8 a 16 nmoles/mL. Cada punto de la curva se midió por triplicado y el promedio de estos valores fue utilizado para graficar la curva de calibración. Las cantidades de los estándares empleadas para la realización de la curva de calibración se describen en la tabla V.

Curva de calibración	MDA (μL)	SDS 8.1% (μL)	Acido acético 20% (mL)	TBA 0.8% (mL)	Agua destilada (μL)
Blanco	0	200	1.5	1.5	800
1	20	200	1.5	1.5	780
2	50	200	1.5	1.5	750
3	100	200	1.5	1.5	700
4	200	200	1.5	1.5	600
5	400	200	1.5	1.5	400

Tabla V. Concentraciones de MDA empleadas para la realización de la curva de calibración.

2.2.9.3 Procedimiento

100 μL del homogenizado se colocaron en un tubo de ensayo con tapón de rosca y se le adicionaron 200 μL de SDS al 8.1%, 1.5 mL de ácido acético al 20%, 1.5 mL de TBA al 0.8% y 700 μL de agua. Las muestras se colocaron en un baño de agua a 95 °C durante 1 hora. Posteriormente se enfriaron en baño de hielo y se les adicionó 1 mL de agua destilada, enseguida se realizó la extracción del complejo formado, mediante la adición de 5 mL de una mezcla de n-butanol y piridina (15:1 v/v) los tubos se agitaron vigorosamente en un vórtex. Por último, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min. La capa orgánica fue utilizada para medir la absorbancia a 532 nm. Los estándares de la curva de calibración y el blanco fueron procesados bajo las mismas condiciones que las muestras.

2.2.9.4 Cálculos

La concentración de MDA de las muestras fue interpolada de la curva de calibración obtenida al graficar el valor de absorbancia contra la concentración de MDA de los estándares, los valores fueron ajustados con el método de mínimos cuadrados (programa estadístico del espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-7500). Los valores de LPO se expresaron en nmol de MDA por mg de proteína.

2.3 Análisis estadístico

Los datos se analizaron a través de un diseño completamente al azar. La comparación de medias se realizó por el método de *Tukey* mediante el programa: Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Se consideró un valor de $p < 0.05$ para establecer significancia estadística.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Modelo de intoxicación por Pb en ratas

La administración de Pb *ad libitum* (3000 ppm) en el agua de beber durante 5 semanas produjo un incremento significativo en los niveles de este metal en sangre (43.3 ± 4.5 $\mu\text{g/dL}$) y órganos. El esquema de administración de Pb (3.5 mg/kg) vía intraperitoneal durante 7 días produjo un incremento significativo en su concentración en sangre y órganos. La concentración de Pb en sangre con este esquema fue de 113 ± 55.6 $\mu\text{g/dL}$. En los esquemas de administración de Pb v.o. en horario matutino y vespertino, no se observó diferencia significativa en los niveles de Pb en sangre y órganos entre los grupos que recibieron el metal en horarios diferentes.

La secuencia de los niveles de Pb en órganos en los tres esquemas evaluados fue: hueso>riñón>hígado>cerebro.

El esquema seleccionado fue el de administración de Pb *ad libitum* con el cual se obtuvo la mayor concentración del metal en hueso. Los niveles de Pb en sangre y órganos de los esquemas evaluados se muestran en la tabla VI.

Grupo	Sangre	Cerebro	Hígado	Riñón	Hueso
control negativo	1.4 ± 0.58	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Pb 3000 ppm (<i>ad libitum</i>)	43.3 ± 4.5*	1.3 ± 0.1*	2 ± 0.02*	12 ± 1.2*	537 ± 102*
Pb 3.5 mg/kg (i.p.)	113 ± 55.6*	0.5 ± 0.3*	27 ± 7.2*	38 ± 10*	52.9 ± 15*
Pb 10 mg/kg (v.o.) matutino	12.5 ± 3.3*	0.5 ± 0.2*	0.8 ± 0.1*	2.5 ± 0.4*	33 ± 17.7*
Pb 10 mg/kg (v.o.) vespertino	11.3 ± 2.0*	0.4 ± 0.2*	0.9 ± 0.1*	2.8 ± 0.3*	33 ± 8.7*

Tabla VI. Niveles de Pb en sangre ($\mu\text{g}/\text{dL}$) y tejidos ($\mu\text{g}/\text{g}$) en ratas Wistar machos intoxicadas por Pb. n = 4. * p < 0.05.

La actividad de la d-ALA fue inhibida en un 70% en el modelo *ad libitum*, un 75% en el i.p y un 53% en los esquemas de administración v.o. matutino y vespertino. Los valores se muestran en la tabla VII.

Grupo	d-ALA
Control negativo	5.7 ± 0.25
Pb 3000 ppm (<i>ad libitum</i>)	1.72 ± 0.30*
Pb 3.5 mg/kg (i.p.)	1.45 ± 0.35*
Pb 10 mg/kg (v.o.) matutino	3.1 ± 0.25*
Pb 10 mg/kg (v.o.) vespertino	3.0 ± 0.30*

Tabla VII. Actividad de d-ALA (nmol de PBG/min/ml de eritrocitos). * p < 0.05. n = 4

3.2 Efecto del DMSA y antioxidantes (Vitamina C, metionina y glicina) administrados como terapia individual y combinada sobre los niveles de Pb en sangre.

Los niveles de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb durante 5 semanas y tratadas con DMSA y antioxidantes administrados como terapia individual y combinada se muestran en la tabla VIII.

Tratamiento	Pb en sangre Dosis baja ^a	Pb en sangre Dosis media ^b	Pb en sangre Dosis alta ^c
Control (-)	0.65 ± 0.23	0.65 ± 0.23	0.65 ± 0.23
Control Pb (+)	39.2 ± 5.1	39.2 ± 5.1	24.3 ± 3.6
DMSA (182 mg/kg)	12.3 ± 2.9	12.3 ± 2.9	-----
Vitamina C	47.2 ± 2.8	43.4 ± 7.1	22.0 ± 2.9
Metionina	40.0 ± 2.1	42 ± 6.1	19.3 ± 3.0
Glicina	40.5 ± 2.3	39.1 ± 2.1	22.5 ± 1.9
DMSA + Vitamina C	16.2 ± 1.5	10.2 ± 1.6	-----
DMSA + Metionina	10.3 ± 2.5	16.4 ± 3.6	-----
DMSA + Glicina	10.5 ± 1.6	11.3 ± 1.2	-----

Tabla VIII. Valores promedio y desviación estándar de la concentración de Pb en sangre (µg/dL). a) Dosis baja de antioxidantes (100 mg/kg/5 días). b) Dosis media de antioxidantes (500 mg/kg/5 días). c) Dosis alta de antioxidantes (1000 mg/kg/28 días).

3.2.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en sangre.

La concentración de Pb en sangre del grupo control positivo el cual fue expuesto a Pb y no recibió tratamiento fue de $39.2 \pm 5.1 \mu\text{g/dL}$. La Vitamina C, metionina y glicina administradas como terapia individual a la dosis de 100 mg/kg durante 5 días, no disminuyeron los niveles de Pb en sangre. El DMSA administrado a una dosis de 182 mg/kg durante 5 días produjo una disminución significativa de los niveles de Pb en sangre ($12.3 \pm 2.9 \mu\text{g/dL}$). No se observó diferencia significativa entre los grupos que recibieron terapia combinada de Vitamina C, metionina o glicina con DMSA y el grupo que sólo recibió DMSA. Figura 4.

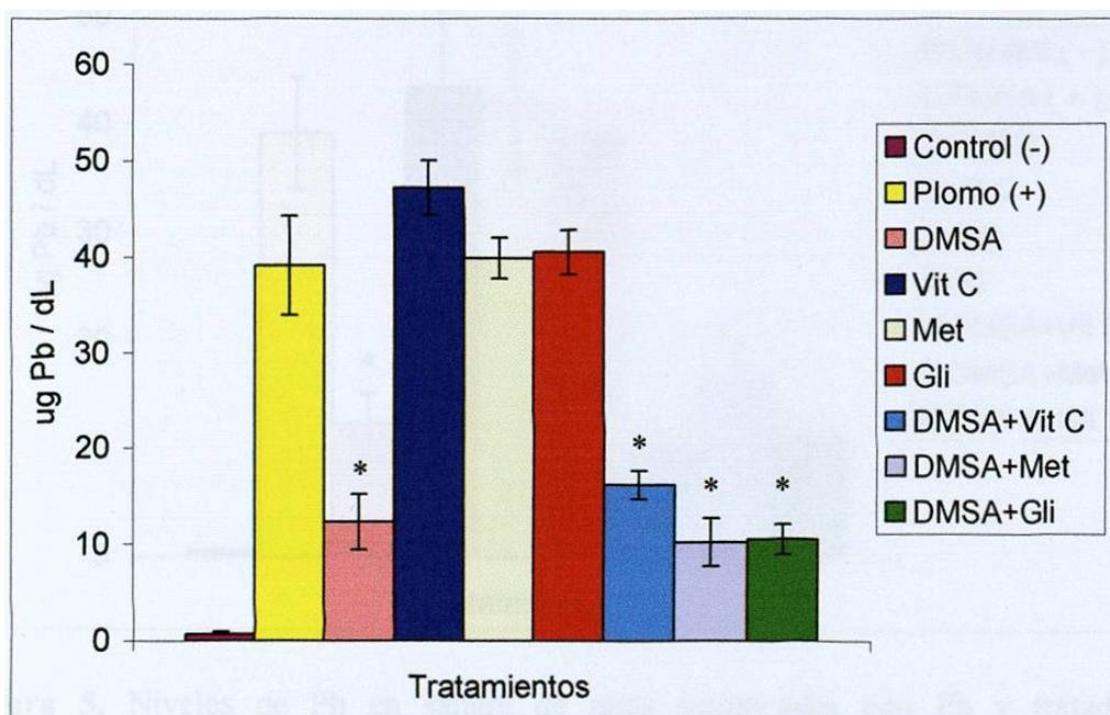


Figura 4. Niveles de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. * $p < 0.05$ comparados con el grupo control (+). $n = 5$

3.2.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en sangre.

No se observó diferencia significativa en la concentración de Pb en sangre de los grupos que recibieron el tratamiento con Vitamina C, metionina y glicina administrados como terapia individual a la dosis de 500 mg/kg y el grupo control positivo. Por otro lado, los valores de Pb en sangre de los grupos que recibieron como tratamiento la combinación de cada uno de los antioxidantes con el DMSA no mostraron diferencia significativa con el grupo que sólo recibió DMSA. Figura 5.

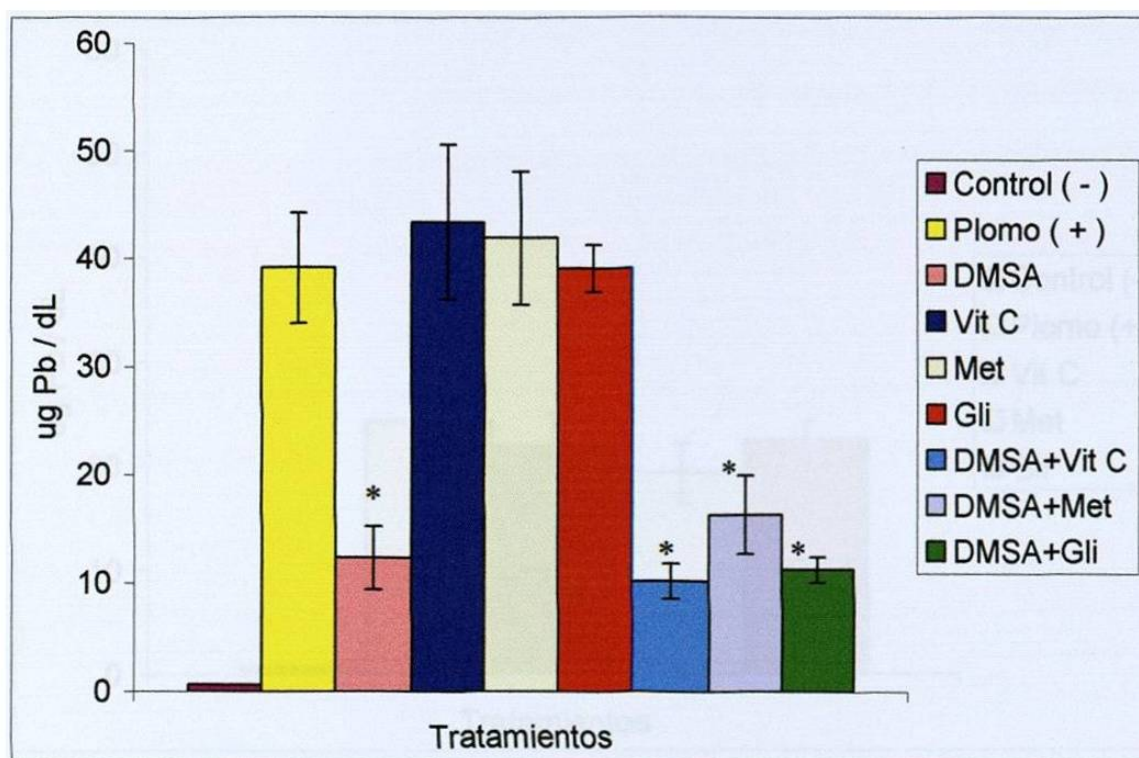


Figura 5. Niveles de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. * $p < 0.05$ comparados con el grupo control (+). $n = 5$

3.2.3 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en sangre.

No se observó diferencia significativa entre los valores de Pb en sangre de los grupos que recibieron el tratamiento con Vitamina C, metionina o glicina administrados como terapia individual a la dosis alta (1000 mg/kg) y el grupo control positivo. Figura 6. Por lo anterior no se evaluó la combinación de los antioxidantes a la dosis alta con el DMSA para determinar sinergismo ya que individualmente no produjeron quelación del Pb en sangre.

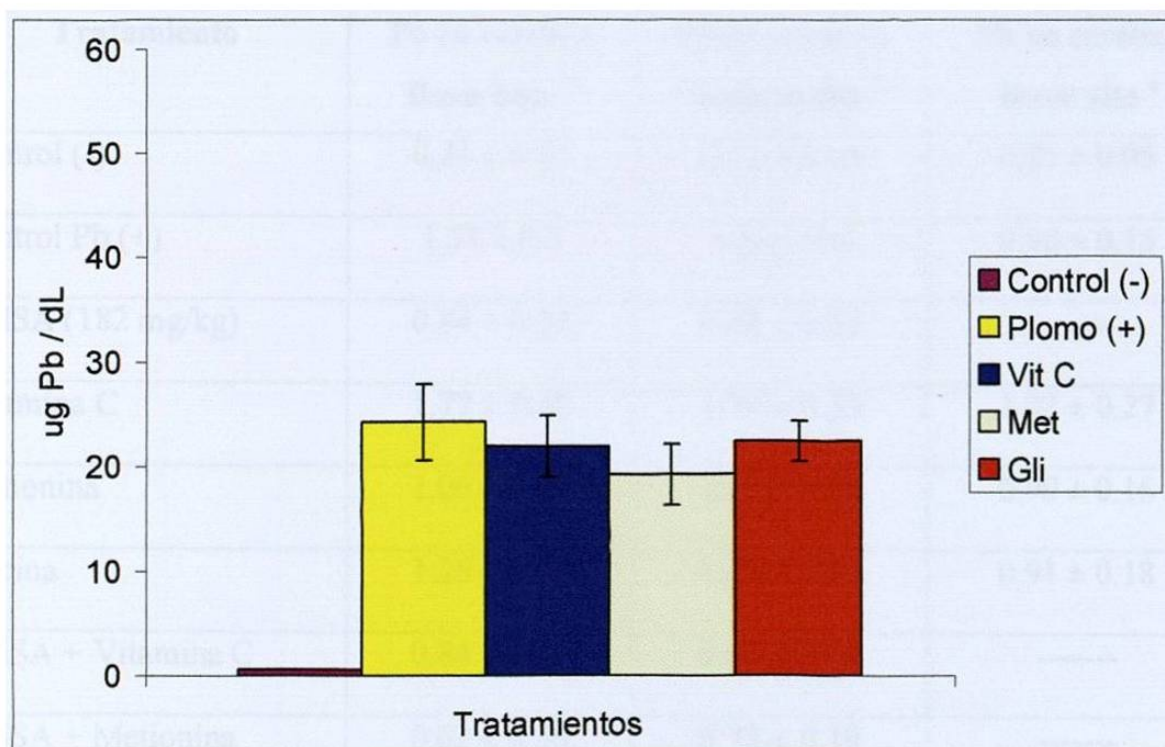


Figura 6. Niveles de Pb en sangre de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta). n = 5

3.3 Efecto del DMSA y antioxidantes (Vitamina C, metionina y glicina) administrados como terapia individual y combinada sobre los niveles de Pb en órganos.

3.3.1. Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de Pb en cerebro.

Los niveles de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb durante 5 semanas y tratadas con DMSA y antioxidantes administrados como terapia individual y combinada se muestran en la tabla IX.

Tratamiento	Pb en cerebro Dosis baja ^a	Pb en cerebro Dosis media ^b	Pb en cerebro Dosis alta ^c
Control (-)	0.21 ± 0.05	0.21 ± 0.05	0.21 ± 0.05
Control Pb (+)	1.54 ± 0.3	1.54 ± 0.3	0.90 ± 0.15
DMSA (182 mg/kg)	0.84 ± 0.22	0.84 ± 0.22	-----
Vitamina C	1.77 ± 0.35	1.30 ± 0.33	1.02 ± 0.27
Metionina	1.06 ± 0.25	1.27 ± 0.08	0.90 ± 0.16
Glicina	1.25 ± 0.24	1.41 ± 0.24	0.91 ± 0.18
DMSA + Vitamina C	0.84 ± 0.19	0.84 ± 0.21	-----
DMSA + Metionina	0.62 ± 0.36	0.72 ± 0.19	-----
DMSA + Glicina	0.83 ± 0.14	0.96 ± 0.13	-----

Tabla IX. Valores promedio y desviación estándar de la concentración de Pb en cerebro ($\mu\text{g/g}$ de tejido). $n = 5$. a) Dosis baja de antioxidantes (100 mg/kg/5 días). b) Dosis media de antioxidantes (500 mg/kg/5 días). c) Dosis alta de antioxidantes (1000 mg/kg/28 días).

3.3.1.1 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en cerebro.

La concentración de Pb del grupo control positivo fue de $1.54 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$ de tejido. No se observó diferencia significativa entre los niveles de Pb en cerebro de los grupos que recibieron Vitamina C, metionina o glicina administrados como terapia individual a la dosis de 100 mg/kg (baja) durante 5 días y el grupo control que no recibió tratamiento. El DMSA (182 mg/kg) produjo una disminución significativa de la concentración de Pb en cerebro ($0.84 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ de tejido). No se observó diferencia significativa entre el grupo que sólo recibió DMSA y los que fueron tratados con el DMSA combinado con cada uno de los antioxidantes durante 5 días. Figura 7.

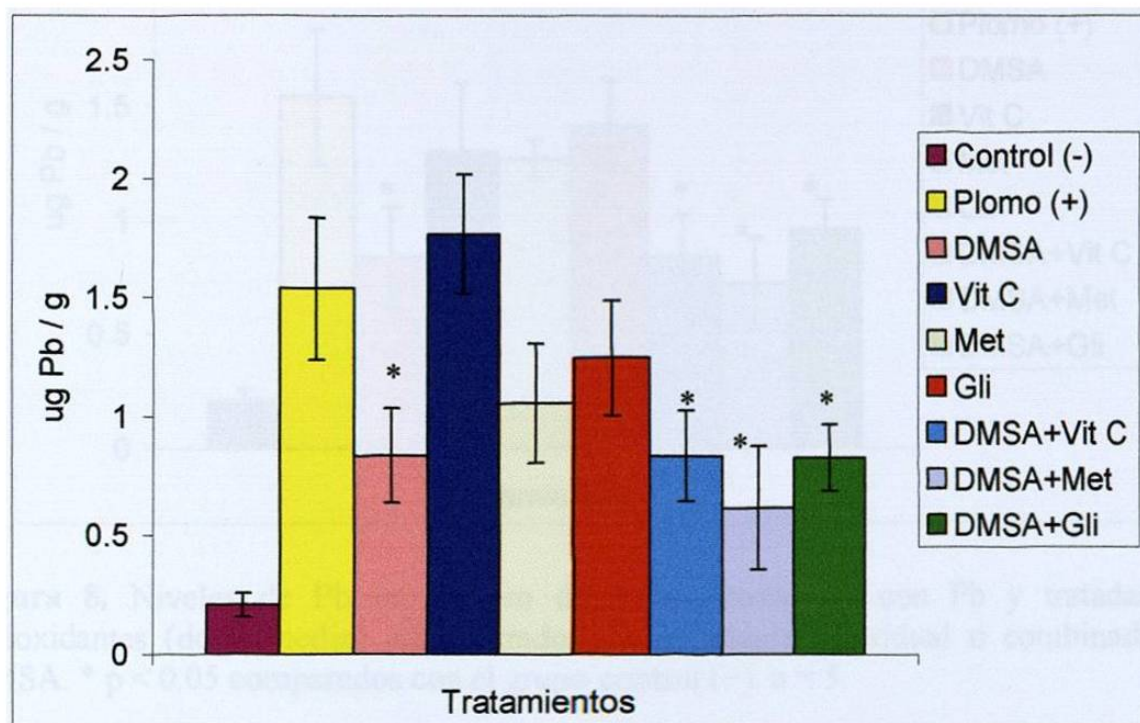


Figura 7. Niveles de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. * $p < 0.05$ comparados con el grupo control (+). $n = 5$

3.3.1.2. Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en cerebro.

La Vitamina C, metionina o glicina administradas como terapia individual a la dosis de 500 mg/kg durante 5 días no produjo disminución de los niveles de Pb en cerebro. El DMSA administrado como terapia individual disminuyó significativamente los niveles de Pb en cerebro. No se observó diferencia significativa entre el grupo que recibió DMSA y los que recibieron DMSA combinado con cada uno de los antioxidantes a la dosis media.

Figura 8.

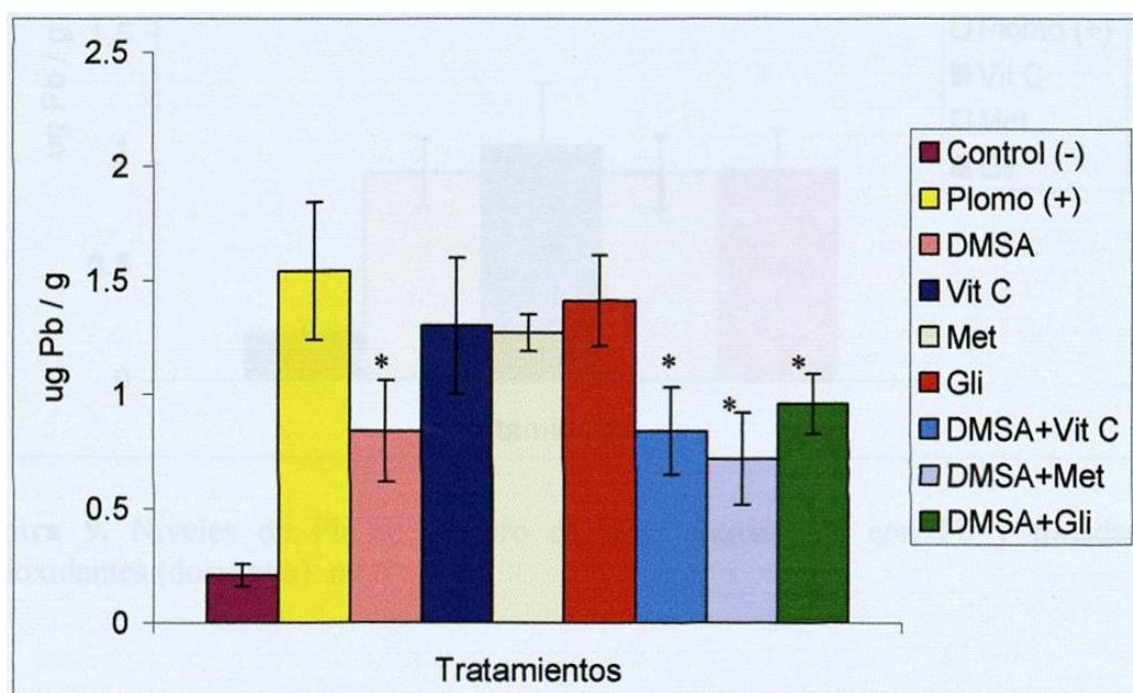


Figura 8. Niveles de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. * $p < 0.05$ comparados con el grupo control (+). $n = 5$

3.3.1.3. Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis alta) sobre los niveles de Pb en cerebro.

La administración de Vitamina C, metionina o glicina a la dosis de 1000 mg/kg durante 28 días no produjo disminución de los niveles de Pb en cerebro en relación al grupo control positivo. Figura 9.

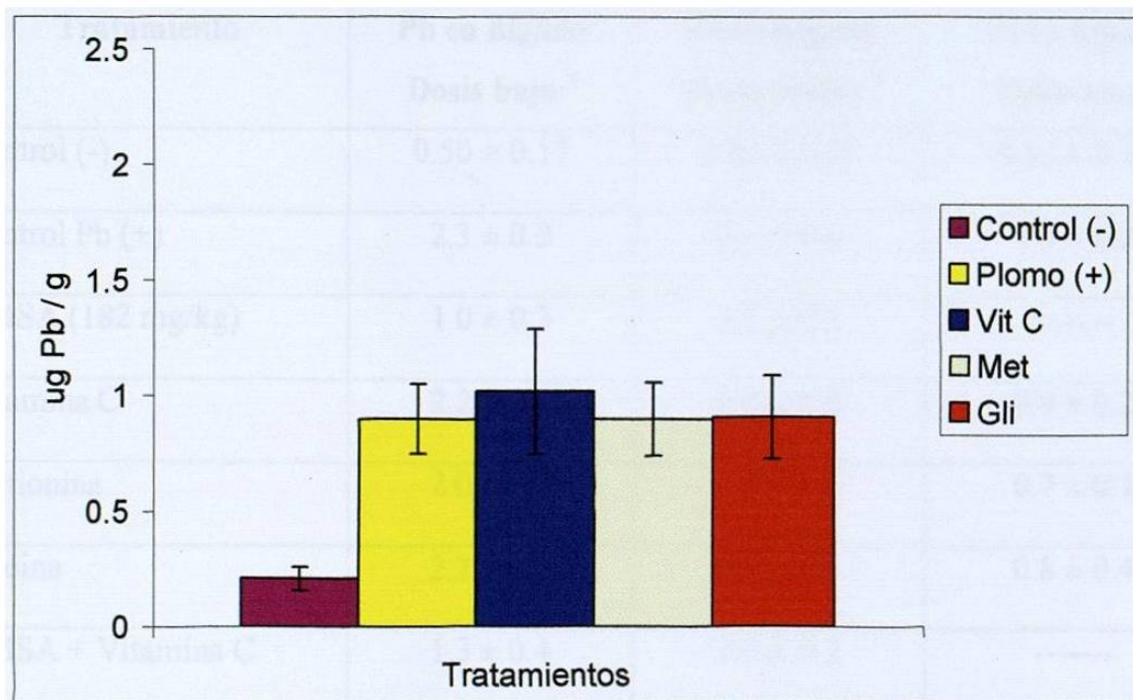


Figura 9. Niveles de Pb en cerebro de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis alta). n= 5

3.3.2 Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina sobre los niveles de Pb en hígado.

Los niveles de Pb en hígado de ratas intoxicadas con Pb durante 5 semanas y tratadas con DMSA y antioxidantes administrados como terapia individual y combinada se muestran en la tabla X.

Tratamiento	Pb en hígado Dosis baja ^a	Pb en hígado Dosis media ^b	Pb en hígado Dosis alta ^c
Control (-)	0.50 ± 0.17	0.50 ± 0.17	0.50 ± 0.17
Control Pb (+)	2.3 ± 0.3	2.3 ± 0.3	1.0 ± 0.2
DMSA (182 mg/kg)	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	-----
Vitamina C	2.2 ± 0.2	1.9 ± 0.5	0.9 ± 0.2
Metionina	2.0 ± 0.2	1.7 ± 0.5	0.7 ± 0.1
Glicina	2.2 ± 0.2	1.9 ± 0.3	0.8 ± 0.4
DMSA + Vitamina C	1.3 ± 0.4	1.0 ± 0.2	-----
DMSA + Metionina	1.1 ± 0.4	0.9 ± 0.3	-----
DMSA + Glicina	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	-----

Tabla X. Valores promedio y desviación estándar de la concentración de Pb en hígado ($\mu\text{g/g}$ de tejido). $n = 5$. a) Dosis baja de antioxidantes (100 mg/kg/5 días). b) Dosis media de antioxidantes (500 mg/kg/5 días). c) Dosis alta de antioxidantes (1000 mg/kg/28 días).

3.3.2.1. Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis baja) sobre los niveles de Pb en hígado.

La concentración de Pb en hígado del grupo control positivo fue de $2.3 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$ de tejido. No se observó diferencia significativa en los niveles de Pb en este órgano entre los grupos que recibieron Vitamina C, metionina o glicina administrados como terapia individual a la dosis de 100 mg/kg (baja) durante 5 días y el grupo control que no recibió tratamiento. El DMSA administrado como terapia individual produjo una disminución significativa de los niveles de Pb en hígado ($1.0 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$ de tejido). No se observó diferencia significativa entre el grupo que sólo recibió DMSA y los que recibieron DMSA combinado con cada uno de los antioxidantes. Figura 10.

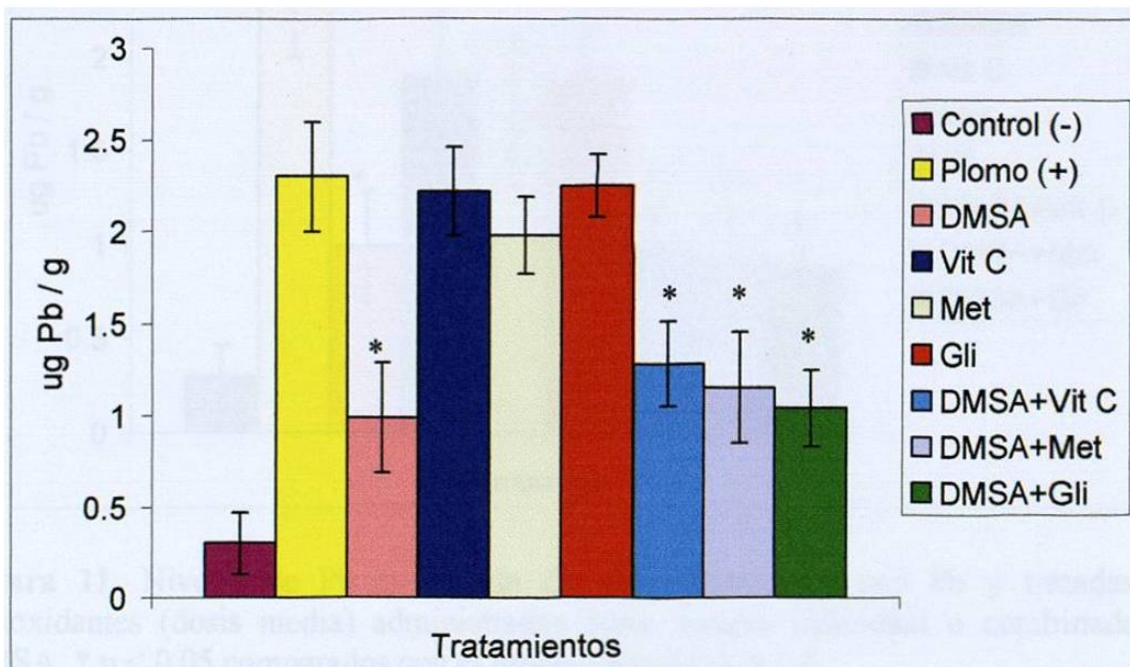


Figura 10. Niveles de Pb en hígado de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis baja) administrados como terapia individual o combinada. * $p < 0.05$ comparados con el grupo control (+). $n = 5$

3.3.2.2. Efecto de la administración de Vitamina C, metionina y glicina (dosis media) sobre los niveles de Pb en hígado.

La administración de Vitamina C, metionina o glicina como terapia individual a la dosis de 500 mg/kg durante 5 días no produjo disminución en los niveles de Pb en hígado. Por otra parte, en el grupo tratado con DMSA se observó una disminución significativa de los niveles de Pb en este órgano. No se observó diferencia significativa entre los grupos que recibieron terapia individual con DMSA y los que recibieron DMSA combinado con cada uno de los antioxidantes. Figura 11.

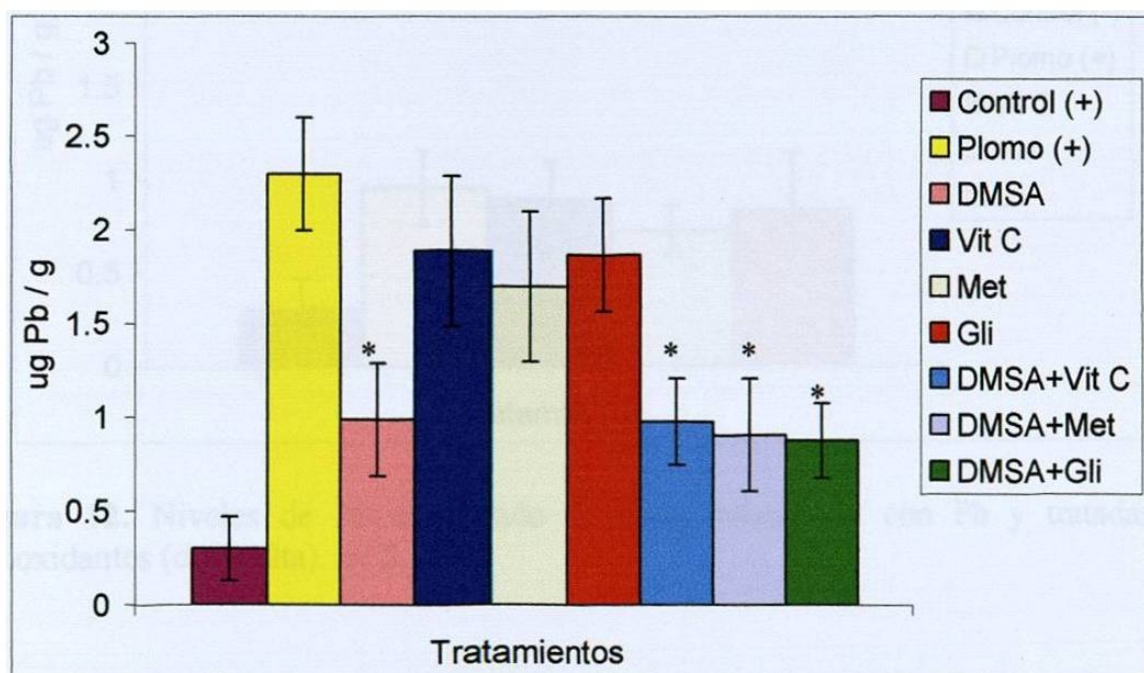


Figura 11. Niveles de Pb en hígado de ratas intoxicadas con Pb y tratadas con antioxidantes (dosis media) administrados como terapia individual o combinada con DMSA. * $p < 0.05$ comparados con el grupo control (+). $n = 5$